

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

G01N 27/30

G01N 33/50



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96102583.2

[43]公开日 1997年3月26日

[11] 公开号 CN 1146016A

[22]申请日 96.2.28

[30]优先权

[32]95.2.28 [33]JP[31]40157/95

[32]95.3.30 [33]JP[31]72585/95

[71]申请人 松下电器产业株式会社

地址 日本大阪

[72]发明人 吉冈俊彦 池田信 南海史朗

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

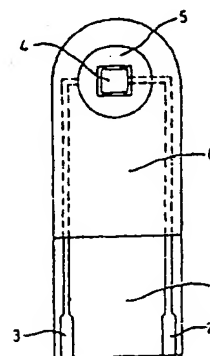
代理人 程伟

权利要求书 3 页 说明书 17 页 附图页数 4 页

[54]发明名称 生物传感器

[57]摘要

本发明的生物传感器包含一个电绝缘的基板；一个形成在该基板上并含有一个工作电极和一个反电极的电极系统；以及一个形成在该基板上或者形成在该基板上并含有一个间隙的反应层。该反应层含有一种氧化吡喃糖的酶。



(BJ)第 1456 号

说明书

生物传感器

本发明涉及一种生物传感器，它能够精确、快速和容易地定量测定含在例如全血液、血浆、血清、尿液、果汁之类的样品液体中的底物（特定成分）。较具体地说，本发明涉及一种葡萄糖传感器，它通过使葡萄糖与一种能够和葡萄糖起特异反应的氧化还原酶作用而用电化学技术测量含在样品液体中的葡萄糖浓度。

作为定量分析糖类（例如蔗糖和葡萄糖）的手段，已经开发了各种方法，例如旋光法、比色法、还原滴定法（*reductimetry*）以及其他利用各种色谱分析的方法等。然而，这些方法中没有一个具有足够高的精度，这是因为它们对糖类的特异性不是很高。在这些方法中，旋光法可以容易地实现，但已知它受到工作温度的很大影响。

近来，开发了各种类型的生物传感器，它们不需要稀释和搅拌样品液体就能够容易地定量测定含在例如生物样品和食品等样品液体中的特定成分（底物）。

例如，日本专利公开NO. 3 - 2 0 2 7 4 6 公开了一种生物传感器，它包括一个用网板印刷之类方法形成在一个绝缘基板上的电极系统和一个形成在该电极系统上的反应层，该反应层含有一种亲水聚合物，一种氧化还原酶、和一种电子受体。用这种生物传感器测量样品液体中的底物浓度是如下进行的。首先，把样品液体滴在生物传感器的反应层上，使反应层溶解。这使得在样品液体中的底物和反应层中的氧化还原酶之间发生酶

在本生物传感器中，反应层可以含有一种电子受体，使得不再是在底物氧化反应同时产生过氧化氢，而是在酶反应的同时形成电子受体的还原形态。电子受体的例子有二氰铁酸根离子、p - 苯醌或其衍生物、吩嗪硫酸甲酯 (phenazine methosulfate)、亚甲蓝、以及二茂铁或其衍生物。可以使用一种或多种电子受体。特别地，优选为氰铁酸根离子。

氰铁酸根离子的含量优选为每平方厘米的反应层中约0.21至约3.30 mg，更优选为约0.30至约2.59 mg。当氰铁酸根离子的含量小于每平方厘米的反应层中约0.21 mg时，可测的葡萄糖浓度范围可能极小。当氰铁酸根离子的含量大于每平方厘米的反应层中约3.30 mg时，则因为反应层在形成时可能被损坏，从而可能引起反应电流值的不稳定，而且该生物传感器在储藏期间其可靠度可能下降。

本生物传感器中所用的反应层还可以含有一种多糖水解酶，用来使多糖水解以产生 α -葡萄糖。多糖水解酶是一种能够使例如蔗糖和麦芽等多糖水解以产生葡萄糖的酶。这种多糖水解酶的例子有：例如转化酶（以下写作INV）等蔗糖水解酶，麦芽糖酶等麦芽糖水解酶，以及 β -半乳糖苷酶等乳糖水解酶。多糖水解酶的含量优选是每方厘米的反应层中1至约400个单位，更优选为约2至约200个单位。

下面将参考图1和2来说明本生物传感器的制作方法。

首先，用网板印刷法在电绝缘基板1上印刷例如银浆这样的导电材料，由此形成引线2和3。然后把另一种含有树脂粘合剂的导电材料印刷在基板1上，由此形

成一个工作电极4，并使之与引线2相连接。

然后在基板1上印刷绝缘浆，由此形成一个绝缘层6。绝缘层6复盖了工作电极4的周边区域，只露出工作电极4的一个固定的面积。如图1所示，绝缘层6也复盖了引线2和3的一部分。环绕工作电极4形成一个由含有树脂粘合剂的导电材料所做成的环形反电极5。反电极5与引线3相连接。这样，就在基板1上形成了一个包括工作电极4和反电极5的电极系统8。

或者，本生物传感器也可以包括一个形成在基板1上的三电极系统，它除了工作电极4和反电极5之外还包括一个参考电极（未示出），其目的是进一步稳定测量精度。

反应层以下述方法形成在基板1上：

把亲水性聚合物的水溶液滴在电极系统8上并使之干燥，由此形成一个亲水性聚合物层。然后，把一种含有 $P y O x$ ，并且在需要时还含有电子受体和/或多糖水解酶的水溶液滴在亲水性聚合物层上，并使之干燥。为了重复使用本生物传感器，可以通过与戊二醛的交联固定在亲水性聚合物层上，或者与聚合物材料一起把氧化吡喃糖的酶和需要时的多糖水解酶固定在亲水性聚合物层上，其中的聚合物材料例如有：硝化纤维素、醋酸纤维素、和聚丙烯腈。再有，如果需要，可以利用聚合物材料把电子受体以化学方法固定在亲水性聚合物层上。这样，如图2所示，就可以形成一个复盖整个电极系统8的反应层7。

或者，反应层也可以位在基板1上方，与基板1之间有一个间隙。在该情形下，如图3所示，该生物传感器包括一个基板1和一个位在基板1上方的盖板30，

说明书附图

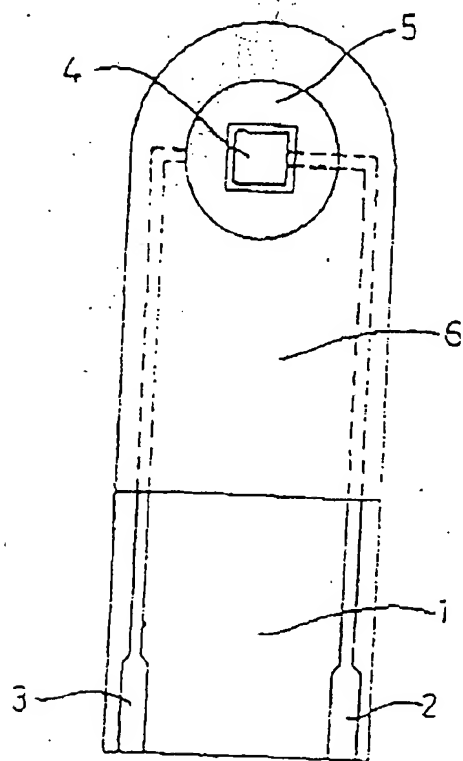


图1

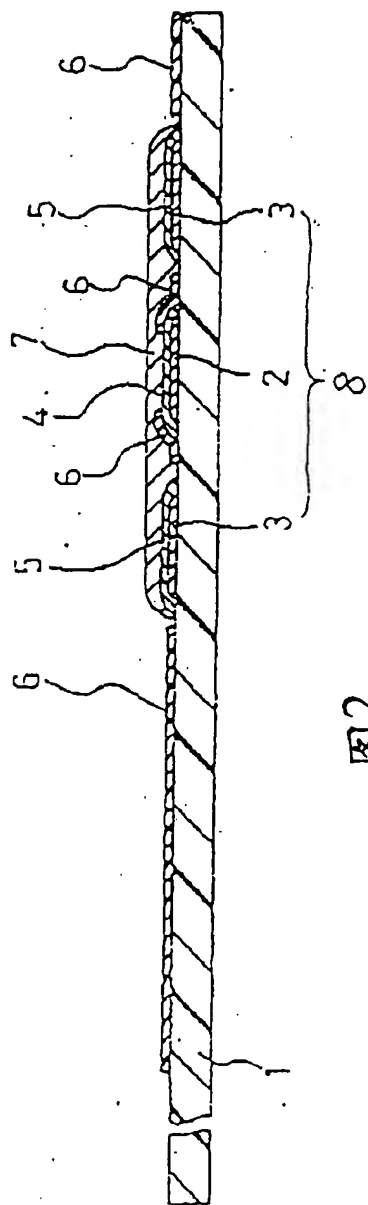


图2

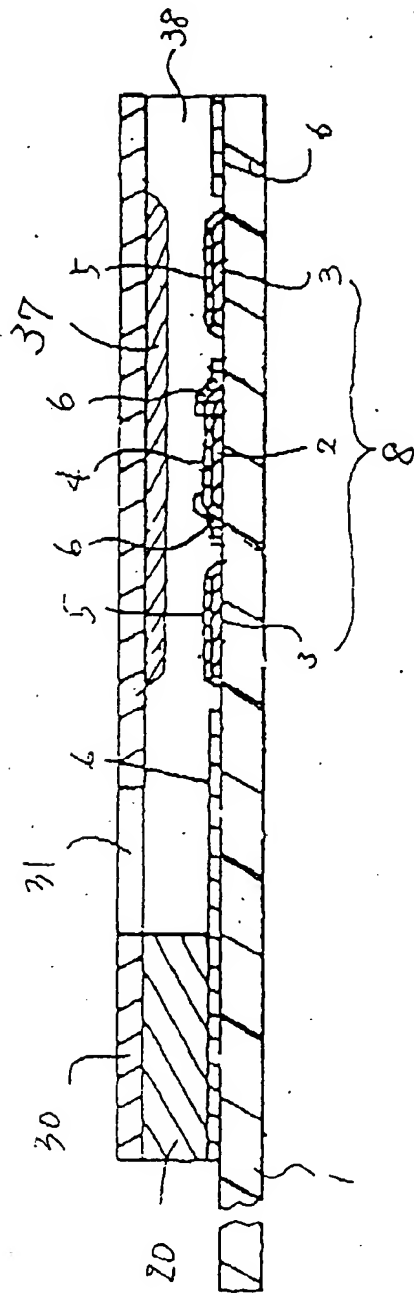


图3

硫醇/金自组装膜上组装葡萄糖氧化酶及其应用

孙 灏¹ 王洪恩²

(¹ 东北师范大学生命科学学院 ² 济宁医学院分子医药学实验室)

提 要 目的 研制一种新的电流式葡萄糖传感器。方法 这种传感器的制作方法是固定葡萄糖氧化酶于聚合物复合膜中,并且这种复合膜形成于金电极上的硫醇自组装膜之上。葡萄糖氧化酶和钼-聚乙烯基吡啶配合物的复合膜是在硫醇自组装膜上混合葡萄糖氧化酶和钼-聚乙烯基吡啶形成。结果 以上方法制成的多层有序膜中 Os 配合物作为电子传递体,对葡萄糖的响应在 1-20 mmol/L 范围内呈线性。结论 这种酶电极具有高度的稳定性,并对抗坏血酸有较强的抗干扰能力。

关键词 葡萄糖氧化酶;自组装膜;聚(4-乙烯基)吡啶钼配合物

利用有机分子在金属或其它基底表面自
动吸附而形成高度有序的分子自组装膜可用
于在电极表面进行分子设计及相关研究,由
于其具有明晰的微结构,为电化学研究提供

了一个重要的实验场所,可在分析化学领域
得到广泛应用^[1-3]。利用聚阳离子和阴离
子之间的相互吸引而形成聚电解质复合膜,
并可固定蛋白质、酶等生物分子。这种膜可

A DUAL ROLE OF L- ARGININE BY INJECTED INTO CEREBRAL VENTRICULAR OF RATS IN PAIN THRESHOLD

Bai Bo, Liu Wenyan, Shi Weiqing, et al.

(Lab. of Neurophysiology, Jining Medical College)

Abstract *Objective* To study of the roles of large dose L- arginine (L- Arg) which was injected into cerebral ventricular of rats in pain threshold (PT). *Methods* With the use of potassium iontophoresis induced tail- flick for measuring the pain threshold of rats. The precursor of nitric oxide (NO) which was L- Arg was injected into cerebral ventricular of rats. The effects of large dose L- Arg on pain threshold was investigated in rats. *Result* Large dose L- Arg (160 mmol) administration attenuated immediately (2 min) the pain threshold; then the pain threshold was increased gradually. After injection 15 min, the pain threshold was enhanced significantly compared with that of control groups. In addition, that the pain threshold decreased remarkably by microinjecting L- Arg (20 mmol) was observed. *Conclusion* The results suggested that large dose L- Arg by injected into cerebral ventricular may be play a dual role in pain threshold in central nervous system of rats.

Key words L- arginine, Pain, pain threshold, Nitric oxide

用于生物化学传感器的设计与制造⁽⁴⁾。本文用 4- 巯基 - 1- 丁磺酸在金电极表面形成含负电荷基团的自组装膜,再于自组装膜表面形成葡萄糖氧化酶(GOD)和聚(4- 乙烯基)吡啶钌配合物膜,研究了该膜电极的电化学性质及作为葡萄糖电化学传感器的特性。该酶电极具有制备方便、响应速度快、抗干扰能力强等特点。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

聚(4- 乙烯基)吡啶(PVP)及 Nafion 购自 Aldrich 公司,葡萄糖氧化酶及 4- 巯基 - 1- 丁磺酸(MPS)购自 Sigma 公司,Os(bpy)₂Cl₂,聚(4- 乙烯基)吡啶钌配合物(Os-PVP)参照文献合成⁽⁵⁾。其它试剂均为分析纯试剂,实验用溶液均用二次蒸馏去离子水配制,实验之前用氮气除氧 15min。

实验在 CH-Instruments work station (美国 CH 公司)电化学系统上进行,采用三电极系统。饱和甘汞电极(SCE)为参比电极,铂柱电极为对电极,金盘电极为工作电极($\Phi = 0.5\text{ mm}$)。

1.2 实验步骤

首先将金电极在含 1 mmol/L MPS 乙醇溶液中浸泡 24h 形成自组装膜(SAM)。然后用微量注射器将 1 μL 含 15g/L 的 Os-PVP 溶液涂敷于电极的表面,室温下放置 5-10min 后,再用微量注射器将 1 μL 含 10g/L GOD 的溶液涂敷于电极的表面,Os-PVP 先在 SAM 膜上吸附而形成一层 Os-PVP 膜,带负电荷的 GOD 分子便和带正电荷基团的 Os-PVP 形成聚电解质复合物而固定于电极的表面。在室温下凉干,即得含 Os-PVP 和 GOD 的酶电极。为保证酶层的稳定性,再于酶层表面涂敷一层 Nafion 膜。该复合膜的结构如图 1 所示。

2 结果与讨论

2.1 酶电极的电化学行为

图 2a 是酶电极在空白磷酸盐缓冲溶液(pH6.88)中的循环伏安图(CV),图中有一

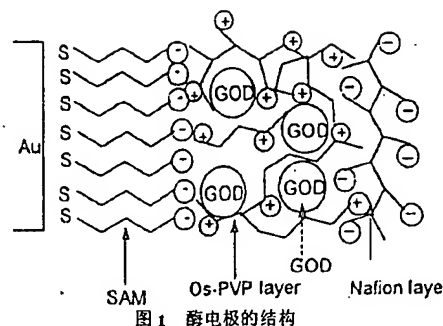


图 1 酶电极的结构

对氧化还原峰, $E_{pa} = 0.28\text{ V}$, $E_{pc} = 0.24\text{ V}$ (扫速 20 mV/s), $E^0 = 0.26\text{ V}$, 它与 Nafion-Os-PVP 复合物膜电极的氧化还原峰电位相近($E_{pa} = 0.27\text{ V}$, $E_{pc} = 0.24\text{ V}$)。扫速较低时($< 20\text{ mV/s}$), 峰电流和扫速成正比且峰电位之差几乎不随扫速变化, 表明 Os-PVP 在电极表面的电化学过程为一受扩散控制的过程。在 5 mV/s 时, 通过对 CV 图中氧化峰电流进行积分, 可求得电极表面钌配合物的覆盖率(Γ)为 $8.2 \times 10^{-9}\text{ mol/cm}^2$ 。以上结果表明, GOD 的存在对膜中 Os-PVP 的氧化还原特性没有影响。

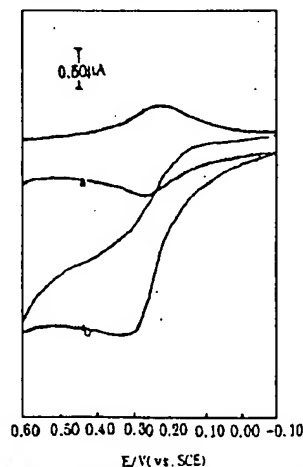
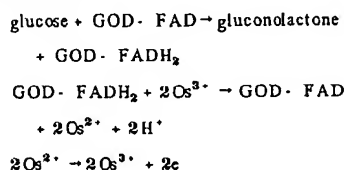


图 2 酶电极在磷酸盐缓冲液(pH6.88)中的循环伏安图
a: 不含葡萄糖, b: 50.0 mmol/L 葡萄糖。

2.2 酶电极对葡萄糖的电化学响应

图 2b 是酶电极在含有葡萄糖的磷酸盐缓冲液中的 CV 图, 由图可知, 酶电极在含葡萄糖的溶液中, 其 CV 图中有一催化氧化电流产生, 而还原峰电流近乎消失, 这表明钌配合

物可促进酶和电极之间的电子传递,即 GOD 和葡萄糖作用而被还原而生成还原态的 GODred, GODred 被 Os^{3+} 氧化而重新生成 GOD, 然后 Os^{2+} 再和 Os -PVP 链中的 Os^{3+} 进行电子交换而将电子传递到电极表面,其过程可表示如下^[4-7]:



利用恒电位法,工作电位一定时,可得到电极对葡萄糖的稳态响应电流,响应时间在 20 秒以内。该响应时间较短,葡萄糖浓度在 $1 \text{ mmol/L} \sim 20 \text{ mmol/L}$ 范围内与响应电流成线性关系(见图 3a)。

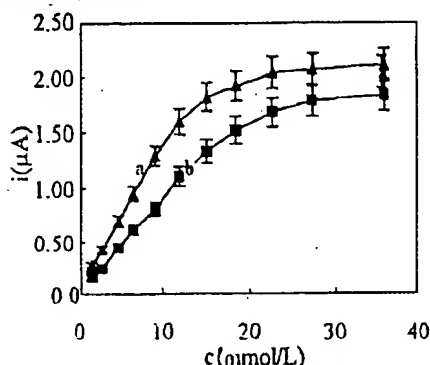


图 3 酶电极对葡萄糖的响应曲线
a: 未覆盖 Nafion b: Nafion 覆盖后

2.3 酶含量对电极性能的影响

实验中固定 Os -PVP 的含量,改变涂饰酶溶液的体积,可得不同酶含量的酶电极,实验发现,酶层中酶的含量不同,响应电流和线性范围发生变化,酶电极对葡萄糖的响应电流随酶的含量增加而增加,但同时其线性响应范围减小。本文采用 1:1 的配比($1 \mu\text{L}$ 含 GOD 的溶液加 $1 \mu\text{L}$ 含 Os -PVP 的溶液)。

2.4 干扰实验

对于一般的 GOD 电极,抗坏血酸可在测定电位发生氧化,产生的氧化电流常常干扰葡萄糖测定。而对于在 SAM 膜表面形成的酶电极,抗坏血酸对测定几乎不产生影响。

主要原因在于 MPS-SAM 是一种表面含负电荷基团的膜,它对抗坏酸产生排斥作用,使其不易到达电极表面进行反应。 1.0 mmol/L 的抗坏血酸在 MPS-SAM 膜电极上的氧化电流仅是其在裸金电极上的 5%。因而,在 MPS-SAM 膜表面涂饰酶层,可有利于消除抗坏酸的干扰。同时,聚合物 Nafion 膜亦对抗坏血酸有阻碍作用。因此,通过 MPS-SAM 和聚合物膜的共同作用,基本可以消除抗坏血酸对葡萄糖测定的干扰。

在工作电位为 $0.1 \sim 0.3 \text{ V}$ 时, 10 mmol/L 的果糖、乙二醇、蔗糖及尿酸不干扰测定。

2.5 Nafion 涂层对电极性质的影响

实验发现 Nafion 层的加入从三个方面影响着电极的性质:

(1) Nafion 涂层的加入使得电极对葡萄糖的响应范围增大。这主要因为 Nafion 涂层对葡萄糖在膜中的渗透起一种阻碍作用,加入 Nafion 涂层后,葡萄糖在膜中的渗透速度变小,电极对葡萄糖的线性响应范围增大,响应时间增加,响应电流略减小(见图 3b)。

(2) Nafion 涂层的加入使得电极的稳定性增加。这主要因为 Nafion 层对 GOD 的流失有进一步的阻碍作用,从而使其稳定时间延长。

(3) Nafion 涂层的加入使得电极的抗干扰性增强。这主要因为 Nafion 是含阴离子基团的聚合物,其对带负电荷的干扰物有阻碍作用,再加之内层 MPS-SAM 膜的协同作用,抗坏血酸、尿酸等物质的干扰可基本消除。

2.6 电极的稳定性

对浓度 2.0 mmol/L 的葡萄糖溶液进行 10 次测定,其相对标准偏差为 3.3%,电极在 4°C 的条件下干放三周,其响应电流无明显变化。电极寿命比无复合膜(MPS-SAM 及 Os -PVP)的 GOD 电极延长约四周。稳定性增加的原因是由于 Os -PVP 与自组膜中磺酸基之间有静电引力作用,而使 Os -PVP

在电极表面进行稳定地吸附,另一方面由于自组膜的形成使得电极表面形成高度均一的表面,可消除一些干扰物质的电化学响应。

3.7 实际样品的测定

取糖尿病人新鲜尿液 1.0 mL,加入 1 mL pH6.88 的磷酸缓冲液,用电极直接进行测定,测得病人尿液中葡萄糖含量在空腹时为 0.87 g/L,在饭后为 1.4 g/L。其回收率实验见附表。

附表 尿液中葡萄糖测定的回收率实验

试样浓度 (g/L)	加入葡萄糖浓度 (g/L)	实测量 (g/L)	回收率 (%)
0.87	0.50	1.33	92
0.87	1.00	1.90	103
0.87	1.50	2.32	94
1.40	1.0	2.34	96
1.40	1.50	2.87	98
1.40	2.00	3.27	91

3 结 论

在含负电荷基团的硫醇自组装膜表面,利用氧化还原聚合物膜固定 GOD 可制得葡萄糖氧化酶电极。由于自组装膜的作用,电极的寿命延长,同时抗干扰能力增强,尤其对

抗坏血酸的干扰可基本消除。这对于设计新的生物传感器有着较大的意义。

参考文献

1. 李景虹,程广金,董绍俊. 自组装膜技术在电分析化学中的应用. 分析化学,1996,24(9):1093
2. Thompson W R, et al. Hydrolysis and condensation of self-assembled monolayers of (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane on Ag and Au surfaces. Langmuir. 1997; 13:2291.
3. Dalmia A, et al. Electrochemical behavior of gold electrodes modified with self-assembled monolayers with acidic end group for selective detection of dopamine. J. Electroanal. Chem. 1997, 430:205
4. Fishko MV, et al. Amperometric glucose microelectrodes prepared through immobilization of glucose oxidase in redox hydrogels. Anal. Chem. 1991, 63:2268
5. Gregg B A, et al. Cross-linked redox gels containing glucose oxidase for amperometric biosensor applications. Anal. Chem. 1990, 62:258
6. Hale P D, Boguslavsky L I, et al. Amperometric glucose biosensors based on redox polymer-mediator electron transfer. Anal. Chem. 1991, 63:677
7. Ianniello R M, et al. Immobilized enzyme chemically modified as an amperometric sensor. Anal. Chem. 1981, 53:2000

(收稿日期 1998-06-06)

IMMOBILIZED GLUCOSE OXIDASE AT THIOL/ GOLD SELF-ASSEMBLED MONOLAYER AND ITS APPLICATIONS

Sun Hao, Wang Hongen

(Department of Biology, Northeast Normal University)

Abstract Objective A new amperometric enzyme electrode was prepared by immobilizing glucose oxidase in a polymer complex film based on thiol self-assembled monolayer at gold electrode. **Methods** The film of glucose oxidase and Os-PVP (Osmium-polyvinylpyridine) complex were formed by mixing glucose oxidase and Os-PVP solution at thiol self-assembled monolayer. **Results** Os complex acts as electron mediator, and its response to glucose was linear at a range of 1 to 20 mmol/L. **Conclusion** This enzyme electrode shows low interference from ascorbic acid and exhibits higher stability.

Key words Self-assembled monolayer; Glucose oxidase; Osmic complex